

21.08.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 10 OCT 2003

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 8月23日

出願番号  
Application Number: 特願2002-244280

[ST. 10/C]: [JP2002-244280]

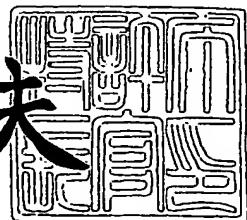
出願人  
Applicant(s): 櫻川 宣男  
内田 彩子  
株式会社エスアールエル

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 02801

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/08

【発明者】

【住所又は居所】 東京都小平市小川町2-1254-25

【氏名】 櫻川 宣男

【発明者】

【住所又は居所】 東京都小平市小川町2-1306-44 コートフロー  
ラ C101

【氏名】 内田 彩子

【特許出願人】

【識別番号】 501043670

【氏名又は名称】 櫻川 宣男

【特許出願人】

【識別番号】 501320261

【氏名又は名称】 内田 彩子

【特許出願人】

【識別番号】 390037006

【氏名又は名称】 株式会社エスアールエル

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト骨幹細胞

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト羊膜間葉細胞層から分離された骨幹細胞。

【請求項2】 ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を含む骨細胞形成用細胞。

【請求項3】 ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨細胞分化用培地で培養することを含む骨細胞の取得方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト羊膜から分離された、新規な骨幹細胞に関する。本発明の細胞は、これを移植することにより、骨の修復等に有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来より、外傷や骨腫瘍の除去等により骨の修復が必要な場合には、患者本人の大腿骨等の自家骨を採取し、これを移植することが行われている。しかしながら、この方法は、患者の負担が大変大きい。一方、再生医学や組織工学の分野では、骨細胞に分化し得る幹細胞(骨幹細胞)を移植することにより骨の修復を行うことが研究されている。従来より、骨幹細胞は、骨髄中や脂肪細胞層中に見出されている。しかしながら、これらは安定供給に難がある。また、これらの骨幹細胞を移植する場合には、拒絶反応を防止するために適合性を調べる必要があり、適合性のない患者に対しては移植ができないという問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、安定供給が可能であり、移植の際の適合性が問題にならない骨幹細胞を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、ヒト羊膜の間葉細胞層に骨幹細胞が存在することを見出し、本発明を完成した。

#### 【0005】

すなわち、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層から分離された骨幹細胞を提供する。また、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を含む骨細胞形成用細胞を提供する。さらに、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨細胞分化用培地で培養することを含む骨細胞の取得方法を提供する。

#### 【0006】

##### 【発明の実施の形態】

上記の通り、本発明の細胞は、ヒト羊膜間葉細胞層から分離されるものである。間葉細胞層は、絨毛膜層と羊膜上皮細胞層との間に位置する。羊膜は、胎児由来の組織であるが、母体由来の胎盤に付着した状態で採取することができ、しかも、子宮内壁の全体を被覆する大きな組織であるので、大量に採取することができる。さらに、胎盤やそれに付着している羊膜は、医療廃棄物として処理されるものであるので、採取に倫理上の問題も生じない。

#### 【0007】

本発明の細胞は、ヒト羊膜の羊膜上皮細胞層+間葉細胞層を絨毛膜層から剥離し、これをトリプシン処理して羊膜上皮細胞を除去し、蛋白分解酵素処理することにより分離することができる。ここで、蛋白分解酵素処理の好ましい例としては、パパイン、コラゲナーゼ、中性プロテアーゼ(neutral protease)及びDNase混合液で処理することを挙げることができるが(下記実施例参照)、これに限定されるものではない。なお、蛋白分解酵素処理することにより分離される細胞には、骨幹細胞以外の細胞も含まれる。一方、細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体(SB-10)は骨細胞に分化する前に発現し、骨細胞に分化後に消失する(Bruder SP et al., J Bone Mineral Res 13: 655, 1998)。そこでSB-10を用いたフローサイトメトリーシステム(自動細胞解析分離装置)を用いることにより、骨幹細胞の分離、培養が可能である。なお、本発明においては、アルカリフィオスファターゼを発現する細胞を骨細胞であると判断する。このような判断は、この分野において認められているものである(Jaiswal N et al., J Cell Biochem 6

4: 295, 1997; Pittenger MF et al., Science 284: 143, 1999)。

#### 【0008】

本発明の骨幹細胞の骨細胞への分化に用いられる骨細胞分化用培地としては、公知の骨細胞分化用培地を採用することができる。このような骨細胞分化用培地の好ましい例としては、100 nMデキサメタゾン、10 mM $\beta$ -ケトセロールリン酸、0.25 mMアスコルビン酸塩(ascorbate)及び10% FBS (ウシ胎児血清)をDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中に含有する培地(Pittenger MF et al., Science 284:143, 1999)を挙げることができる。培養条件は、特に限定されないが、ヒトの体温である37℃で2～4週間程度培養することが好ましい。また、培養は、5% CO<sub>2</sub>ガス霧囲気下で行うことが好ましい。

#### 【0009】

なお、上記本発明の細胞を一次培養又は継代培養をして得られる培養細胞であって、アルカリリフォスファターゼを発現する細胞に分化可能な細胞も本発明の範囲に含まれる。

#### 【0010】

本発明の細胞はヒト羊膜由来であり、羊膜は胎児由来であり、免疫寛容を示す。すなわち免疫組織染色ではHLA Class I には陽性反応を呈し、HLA Class II の染色性はない。またFas ligand 陽性細胞が存在している。最近、羊膜組織が拒絶反応を惹起しにくい理由は、HLA Class Ib (HLA-G)の発現とFas ligand 陽性細胞の存在が拒絶抑制に貢献していると考えられている(眼科42:257-269, 2000)。従って、HLAの適合性を問題にすることなく移植することが可能である。

#### 【0011】

本発明の細胞は、そのまま、あるいは、アルカリリフォスファターゼを発現する骨細胞にまで分化させた後、移植することにより骨の修復や再構成に用いることができる。

#### 【0012】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

## 【0013】

## 実施例1

## 1. 細胞の分離及び培養

インフォームドコンセントを得た妊婦の出産後の胎盤より、羊膜上皮細胞層+間葉細胞層を絨毛膜層から剥離して分離した。0.125%トリプシン溶液+1.3 mM EDTAで37℃で15分間処理した。これを4回繰り返し、トリプシン溶液を遠心して細胞を集め、リン酸緩衝液（PBS）で3回洗った（トリプシン処理分画（比較例1））。消化されなかった組織塊をリン酸緩衝液で洗った後、混合酵素（0.01%パパイン、1 mg/mlコラゲナーゼ、0.01% DNase、0.1%中性プロテアーゼ）で37℃、1時間振盪処理を行った。1000 rpm、10分間遠心し、沈渣をPBSに浮遊させた。20 μmフィルターに通してから、PBSで3回洗浄した（混合酵素処理分画）。

## 【0014】

得られた混合酵素処理分画細胞を、100 nMデキサメタゾン、10 mMβ-グリセロールリン酸、0.25 mMアスコルビン酸塩（ascorbate）及び10% FBS含有DMEM培地（Pittenger et al., Science 284:143, 1999）中、培養皿上で5% CO<sub>2</sub>ガス雰囲気下で37℃で培養した。培地は3～4日後に交換した。

## 【0015】

21日間培養後、市販のアルカリフオスファターゼ検出用キット（Sigma kit 85、Sigma社製）を用いて、組織学的にアルカリフオスファターゼの生産を調べた。アルカリフオスファターゼの組織学的検出は、市販のキットの添付文書通りに行った。

## 【0016】

その結果、アルカリフオスファターゼが明瞭に検出された。これにより、本発明の細胞が、骨細胞に分化可能な骨幹細胞であることが確認された。

## 【0017】

## 【発明の効果】

本発明により、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞が初めて提供された。本発明の骨幹細胞は、羊膜由来であるので、安定供給が可能であり、移植の際

の適合性が問題にならない。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安定供給が可能であり、移植の際の適合性が問題にならない骨幹細胞を提供すること。

【解決手段】 ヒト羊膜間葉細胞層から分離された骨幹細胞、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を含む骨細胞形成用細胞、及びヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨細胞分化用培地で培養することを含む骨細胞の取得方法を提供した。

【効果】 本発明により、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞が初めて提供された。本発明の骨幹細胞は、羊膜由来であるので、安定供給が可能であり、移植の際の適合性が問題にならない。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-244280
受付番号	50201254465
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 8月26日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成14年 8月23日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-244280

出願人履歴情報

識別番号 [501043670]

1. 変更年月日 2001年 1月31日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都小平市小川町2-1254-25  
氏名 櫻川 宣男

特願2002-244280

出願人履歴情報

識別番号 [501320261]

1. 変更年月日 2001年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都小平市小川町2-1306-44 コートフローラC1  
01

氏 名 内田 彩子

2. 変更年月日 2003年 8月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都文京区千駄木3丁目13番17-301号  
氏 名 内田 彩子

特願2002-244280

出願人履歴情報

識別番号

[390037006]

1. 変更年月日

2001年 2月13日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都立川市曙町二丁目41番19号

氏 名

株式会社エスアールエル